

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS



## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER BERICHT ÜBER DIE PATENTIERBARKEIT

REC'D 20 OCT 2005

WIPO PCT

(Kapitel II des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 85HE0725	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Formblatt PCT/PEA/416	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP2004/011875	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 20.10.2004	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 20.10.2003
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K38/19, A61K47/12		
Anmelder HEXAL BIOTECH FORSCHUNGSGMBH		
<p>1. Bei diesem Bericht handelt es sich um den internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, der von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde nach Artikel 35 erstellt wurde und dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt wird.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 13 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p>3. Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; diese umfassen</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> (an den Anmelder und das Internationale Büro gesandt) insgesamt 4 Blätter; dabei handelt es sich um</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Blätter mit der Beschreibung, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit Berichtigungen, denen die Behörde zugestimmt hat (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsvorschriften).</p> <p><input type="checkbox"/> Blätter, die frühere Blätter ersetzen, die aber aus den in Feld Nr. 1, Punkt 4 und im Zusatzfeld angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde eine Änderung enthalten, die über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgeht.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> (nur an das Internationale Büro gesandt) insgesamt (bitte Art und Anzahl der/des elektronischen Datenträger(s) angeben), der/die ein Sequenzprotokoll und/oder die dazugehörigen Tabellen enthält/enthalten, nur in computerlesbarer Form, wie im Zusatzfeld betreffend das Sequenzprotokoll angegeben (siehe Abschnitt 802 der Verwaltungsvorschriften).</p>		
<p>4. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Feld Nr. I Grundlage des Bescheids</p> <p><input type="checkbox"/> Feld Nr. II Priorität</p> <p><input type="checkbox"/> Feld Nr. III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</p> <p><input type="checkbox"/> Feld Nr. IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Feld Nr. V Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</p> <p><input type="checkbox"/> Feld Nr. VI Bestimmte angeführte Unterlagen</p> <p><input type="checkbox"/> Feld Nr. VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</p> <p><input type="checkbox"/> Feld Nr. VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</p>		
Datum der Einreichung des Antrags  09.08.2005	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  19.10.2005	
Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Hars, J  Tel. +49 89 2399-7825  	

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER BERICHT ÜBER DIE PATENTIERBARKEIT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2004/011875

## Feld Nr. I Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Sprache** beruht der Bericht auf der internationalen Anmeldung in der Sprache, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
  - ☐ Der Bericht beruht auf einer Übersetzung aus der Originalsprache in die folgende Sprache, bei der es sich um die Sprache der Übersetzung handelt, die für folgenden Zweck eingereicht worden ist:
    - ☐ internationale Recherche (nach Regeln 12.3 und 23.1 b))
    - ☐ Veröffentlichung der internationalen Anmeldung (nach Regel 12.4)
    - ☐ internationale vorläufige Prüfung (nach Regeln 55.2 und/oder 55.3)
2. Hinsichtlich der **Bestandteile\*** der internationalen Anmeldung beruht der Bericht auf (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt*):

### Beschreibung, Seiten

1-27 in der ursprünglich eingereichten Fassung

### Ansprüche, Nr.

1-25 eingegangen am 09.08.2005 mit Schreiben vom 08.08.2005

### Zeichnungen, Blätter

1/4-4/4 in der ursprünglich eingereichten Fassung

☐ einem Sequenzprotokoll und/oder etwaigen dazugehörigen Tabellen - siehe Zusatzfeld betreffend das Sequenzprotokoll

3. ☐ Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:
  - ☐ Beschreibung: Seite
  - ☐ Ansprüche: Nr.
  - ☐ Zeichnungen: Blatt/Abb.
  - ☐ Sequenzprotokoll (*genaue Angaben*):
  - ☐ etwaige zum Sequenzprotokoll gehörende Tabellen (*genaue Angaben*):
4. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der diesem Bericht beigelegten und nachstehend aufgelisteten Änderungen erstellt worden, da diese aus den im Zusatzfeld angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2 c)).
  - ☐ Beschreibung: Seite
  - ☐ Ansprüche: Nr.
  - ☐ Zeichnungen: Blatt/Abb.
  - ☐ Sequenzprotokoll (*genaue Angaben*):
  - ☐ etwaige zum Sequenzprotokoll gehörende Tabellen (*genaue Angaben*):

\* Wenn Punkt 4 zutrifft, können einige oder alle dieser Blätter mit der Bemerkung "ersetzt" versehen werden.

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER BERICHT ÜBER DIE PATENTIERBARKEIT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2004/011875

---

**Feld Nr. V Begründete Feststellung nach Artikel 35 (2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

---

1. Feststellung
- |                                |                      |
|--------------------------------|----------------------|
| Neuheit (N)                    | Ja: Ansprüche 1-25   |
|                                | Nein: Ansprüche      |
| Erfinderische Tätigkeit (IS)   | Ja: Ansprüche        |
|                                | Nein: Ansprüche 1-25 |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (IA) | Ja: Ansprüche: 1-25  |
|                                | Nein: Ansprüche:     |

2. Unterlagen und Erklärungen (Regel 70.7):

**siehe Beiblatt**

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: EP-A-0 373 679 (AMGEN INC) 20. Juni 1990 (1990-06-20)
- D2: US-A-5 919 443 (MICHAELIS ET AL) 6. Juli 1999 (1999-07-06)
- D3: US-A-5 597 562 (NOMURA ET AL) 28. Januar 1997 (1997-01-28)
- D4: US-A-6 162 427 (BAUMANN ET AL) 19. Dezember 2000 (2000-12-19)
- D5: US-A-5 350 741 (TAKADA ET AL) 27. September 1994 (1994-09-27)
- D6: NOMURA H ET AL: "EFFECT OF A DOSING SOLUTION ON THE NASAL ABSORPTION OF NON-GLYCOSYLATED RECOMBINANT HUMAN GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR IN RATS" BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN (OF JAPAN), PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN, JP, Bd. 19, Nr. 11, 1. November 1996 (1996-11-01), Seiten 1490-1493, XP000636230 ISSN: 0918-6158
- D7: USHIROGAWA Y ET AL: "EFFECT OF ORGANIC ACIDS TRYPSIN INHIBITORS AND DIETARY PROTEIN ON THE PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF RECOMBINANT HUMAN GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR RHG-CSF IN RATS" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS (KIDLINGTON), Bd. 81, Nr. 2-3, 1992, Seiten 133-141, XP002319194 ISSN: 0378-5173
- D8: US-A-5 919 757 (MICHAELIS ET AL) 6. Juli 1999 (1999-07-06)
- D9: US-A-5 078 997 (HORA ET AL) 7. Januar 1992 (1992-01-07)
- D10: US-A-5 151 265 (HWANG-FELGNER ET AL) 29. September 1992 (1992-09-29)
- D11: US-A-4 675 184 (HASEGAWA ET AL) 23. Juni 1987 (1987-06-23)
- D12: US 2003/180253 A1 (CHEN BAO-LU ET AL) 25. September 2003 (2003-09-25)
- D13: EP-A-0 229 016 (SHIONOGI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA; BIOGEN N.V) 15. Juli 1987 (1987-07-15)

Die Änderungen sind erlaubbar.

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

### **V.1 ERFINDUNG**

G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) wässrige Lösungen werden stabilisiert durch Succinat- und/oder Tartratpuffer. Zusätzlich enthalten die Lösungen: Nichtionische Tenside wie Polysorbat-80, Komplexbildner wie Citrat und isotonisierende Mittel wie Mannit. Die Puffer ermöglichen eine Stabilisierung von G-CSF selbst bei isotonischen Lösungen und einem physiologischen pH.

Beansprucht werden eine wässrige Zusammensetzung, letztere als pharmazeutisches Präparat, ein Lyophilisat oder Pulver, ein Kit enthaltend ein Lyophilisat und eine Pufferlösung, Verfahren zur Herstellung der Lösung und des Lyophilisats, die Stabilisierung von G-CSF selbst durch die Puffer, sowie die Verwendung der Lösung oder des Lyophilisats zur Herstellung pharmazeutischer Präparate.

Die Ansprüche sind auf Succinatpuffersysteme beschränkt worden. Die Beschreibung muss noch angepasst werden.

### **V.3 STAND DER TECHNIK**

Sofern nicht anders angegeben wird Bezug genommen auf die im Recherchenbericht hervorgehobenen Textstellen.

NB: Succinat = Salz der Bernsteinsäure

Die pKa Werte von Bernsteinsäure liegen bei 4,17 und 5,64.

D1 - EP0373679

Hydrophobe Glykoproteine (G-CSF, IL-2) können in wässriger Lösung stabil gehalten werden durch einen sauren pH, der kleiner als pH4 sein sollte. Mannitol als isotonisierendes Mittel kann eingesetzt werden, um eine isotonische Lösung zu erhalten. Es wird bevorzugt, keinen Puffer zu verwenden. Falls doch ein Puffer verwendet werden sollte, dann beispielsweise ein Tartratpuffer mit einer Konzentration von 0 bis weniger als

2 mM, bevorzugt 1 mM. Nicht-ionische Tenside wie Tween-80 können zugesetzt werden, wie auch andere zusätzliche Puffer, Komplexbildner, Antioxidantien, etc. G-CSF liegt in einer Konzentration von 0,5-2 mg/mL vor.

Lyophilisierte Proteine, welche mit Wasser oder Kochsalzlösung vor der Verwendung vermischt werden, sind bekannt. EP0373679 beschreibt jedoch selbst nur Lösungen von Proteinen.

#### D2 - US5919443

G-CSF Lyophilisate werden stabilisiert mit Maltose, Raffinose, Sucrose, Trehalose oder Amino-Zuckern als Additive. Darüber hinaus kann die Stabilität durch die Zugabe von folgenden Substanzen gesteigert werden: Aminosäuren wie Arginin, Lysin, Ornithin, Phenylalanin oder Tyrosin; Puffer, wie z.B. ein Tartratpuffer. Pufferkationen sind Alkali-, Erdalkali- oder Ammoniumionen. Die Pufferkonzentration ist vorzugsweise 5-40 mM. Der eingestellte pH liegt bei 4-5 oder 7-8, vorzugsweise im Bereich des pH von Blut, 7,2-7,4. Nicht-ionische Tenside wie Polysorbat-80 werden zugegeben, so wie auch isotonisierende Substanzen.

Um die Lyophilisate herzustellen, wird erst eine wässrige pharmazeutische Lösung hergestellt.

Mannitol wurde als Ersatz von Maltose, Raffinose, etc. in einem Vergleichsbeispiel verwendet und ist weniger geeignet.

#### D3 - US5597562

Orale G-CSF Formulationen (Kapseln) werden hergestellt, wobei der Herstellungsprozess vorsieht:

0,5g Polyoxy 40 Stearat, ein nicht-ionisches Tensid, werden mit 0,2g Linolensäure in 100 mL Citratpuffer vermischt. Zu der Lösung werden 100 mL G-CSF (mit 2 mg/mL), 0,1g L-Arg und 1g Saccharose hinzugegeben.

Nach Mischen wird die Lösung lyophilisiert und es werden 0,1g Bernsteinsäure, 0,1g mikrokristalline Cellulose und 0,1g Magnesiumstearat hinzugegeben. Das resultierende Pulver wird in Tablettenform gebracht.

Als Zucker allgemein können anstatt von Saccharose auch Mannitol oder Sorbitol eingesetzt werden.

**D4 - US6162427**

G-CSF in injizierbaren, wässrigen Lösungen wird mit Standardadjuvanzen wie Stabilisierern, Solubilisierern und Puffern versetzt. Beispiele sind Tartrat- und Citratpuffer sowie Komplexbildner.

**D5 - US5350741**

Während der Herstellung von Tabletten für die orale Anwendung entsteht ein Pulver, welches 400mg L-Weinsäure, 40mg PEG-hydrogenisiertes Castor-Öl und 1,5mg G-CSF enthält.

**D6 - XP000636230**

Die nasale Absorption von wässrigem G-CSF wurde bei Ratten studiert. Die Lösung war mit einem Acetatpuffer auf pH 4 eingestellt, und sowohl der Einfluss des pHs als auch der Einfluss von zusätzlichen Substanzen wurde untersucht.

Ein pH von 2 ist optimal. Unter den zugesetzten Substanzen erwies sich Weinsäure in einer Konzentration von 1% als stark absorptionsverstärkend (AUC von 258 gegenüber 7 bei der Kontrolle).

Die Konzentration von G-CSF betrug 1mg/mL.

Die Autoren spekulieren, dass die Erhöhung der Absorption durch Weinsäure wahrscheinlich mit dem Absenken des pHs auf 2,2 zu erklären ist.

Die Stabilität der Lösungen wurde nicht untersucht.

Das MW von Weinsäure ist 150. Eine 1% Lösung von Weinsäure entspricht daher: 10g/1L  
\*  $1/(150\text{g/mol}) = 0,06667\text{ M} = 66,67\text{ mM}$ .

**D7 - PREV199294043481 - XP002319194**

Wässrige G-CSF Lösungen zur intraduodenalen Injektion an Ratten, enthaltend 150 mM Weinsäure, 150 mM Bernsteinsäure oder 75, 150 oder 250 mM Citronensäure als Absorptionsverstärker.

Die Konzentration von G-CSF lag bei 0,25mg/mL.

Die angesetzten Lösungen wurden 24h bei 4°C gelagert.

Während Bernsteinsäure die Absorption gegenüber der Kontrolle nur um 10% heraufsetzte (Faktor 1,1), waren die Faktoren im Fall von Weinsäure 2,1 und von

Citronensäure bis zu 5,1.

D8 - US5919757

G-CSF wird in wässrigen Lösungen stabilisiert durch die Zugabe eines Puffersystems bestehend aus Essigsäure, Milchsäure, Citronensäure in Kombination mit Phosphorsäure, Maleinsäure, Arginin oder deren Salze, welches typischerweise in einer Konzentration von 5 mM vorliegt und auf einen pH von 2,5-5,0 oder 7-8 eingestellt ist. Darüber hinaus können enthalten sein: Antioxidantien, chaotropische Substanzen, Aminosäure sowie isotonisierende Substanzen wie Mannitol.

Die Lösungen können lyophilisiert oder sprühgetrocknet werden.

D9 - US5078997 - von 1992

IL-2 hat die Neigung, in wässrigen Lösungen auszufallen und ist nicht stabil. Dieses Dokument macht es sich zur Aufgabe, stabile wässrige Lösungen von IL-2 bereitzustellen, welche selbst nach einer Lyophilisierung und folgenden Lösung aktives IL-2 garantieren. Die Lösungen enthalten einen Zucker, bevorzugt Mannitol, einen Puffer in einer Konzentration von 0,01-0,3 M, wobei der Puffer ausgewählt wird von Citrat, Phosphat, Succinat oder Glutarat. Der einzustellende pH liegt bei 6-7,5. Arginin und/oder Camithin werden als stabilisierende Substanzen zugegeben. Eine Dimerbildung durch die hydrophoben Bereiche von IL-2 wird verhindert.

D10 - US5151265 - von 1992

Gamma-Interferon ist nicht stabil in wässrigen Lösungen. Es wurde herausgefunden, dass eine folgende Lösung, mit einem pH von ca. 5,0, Gamma-Interferon in Lösungen und deren lyophilisierte Pulver wesentlich stabiler macht:

- 1 mg/mL gamma-Interferon
- Bernsteinsäure und dessen Salz als Puffer:
  - 0,27 mg/mL Bernsteinsäure (MW=118 g/mol) = 2,3 mmol
  - 0,73 mg/mL Dinatriumsuccinat (MW = 163 g/mol) = 4,5 mmol
- > zusammen also 6,8 mmol
- 40 mg Mannitol
- 0,1 mg Polysorbate 20, ein nichtionisches Tensid

Diese Lösung kann entweder direkt injiziert werden oder lyophilisiert werden.

**D11 - US4675184 - von 1987**

Der Einfluss von verschiedenen Faktoren auf das "Shelf-live" von Interferon wurde untersucht. Als stabilisierende Substanzen kommen Tartrat- und Succinatpuffer in Betracht, die gegenüber der Kontrolle das Shelf-life um den Faktor 3-6 heraufsetzten.

**D12 - US2003180253**

IL-2 in wässrigen Lösungen degradiert durch Aggregation, Methioninoxidation sowie Deamidation. Dies ist seit 1986 bekannt (zitierter Artikel). Darüber hinaus ist IL-2 empfindlich gegenüber Auftauen und mechanischen Scherkräften. Die Aufgabe von D12 war daher, eine monomerische IL-2 Lösung bereitzustellen. Als stabilisierende Substanzen werden daher eingesetzt: Arginin, Methionin, nicht-ionische Tenside wie Polysorbat 80, ein Zucker wie Sorbitol oder Mannitol, und ein Puffer, 10 mM Natriumsuccinat mit einem pH von 5,8.

Die Lösungen können direkt injiziert oder infundiert werden, oder aber zu einem Pulver lyophilisiert werden.

**D13 - EP0229016 - von 1987**

IL-2 aggregiert bei hohem pH (bei ca. 7,6) in wässrigen Lösungen. Es ist daher schwierig, neutrale Lösungen von gefriergetrocknetem IL-2 herzustellen.

Neutrale Lösungen sind jedoch vorteilhaft, da saure Lösungen bei der Injektion zu Schmerzen führen.

Die Stabilität von IL-2 wird erhöht durch Arginin, einen Citrat- oder Tartratpuffer, Mannitol, ein nicht-ionisches Tensid (z.B. Polysorbat 80) und Humanes Serum Albumin (HSA).

Die Lösungen können lyophilisiert werden.

**V.4 NEUHEIT**

**Bemerkungen bezüglich Art. 33(2) PCT**

Keine. Die Ansprüche 1-25 erscheinen neu (Art. 33(2) PCT).

**V.5 ERFINDERISCHE TÄTIGKEIT**

**Bemerkungen bezüglich Art. 33(3) PCT**

**Kit**

Die Offenbarung von D7, welche Bernsteinsäure in einer Konzentration von 150 mM als Absorptionsverstärker verwendet, zeigt weiter, dass die Absorption durch Bernsteinsäure nur schwach, dh um 10%, gesteigert werden konnte gegenüber der Kontrolle. Citronensäure erwies sich als wesentlich effektiver (Faktor 5,1).

Ansprüche, die den Gehalt an Succinat auf 0,5-100 mM begrenzen, sind klar von D7 abgegrenzt und der Fachmann hätte auf der Basis von D7 keinerlei Anhaltspunkt gehabt, andere Konzentrationen von Bernsteinsäure als die angegebenen 150 mM zu verwenden - er hätte nicht weitere Konzentrationen getestet, sondern Citronensäure, welche wesentlich effektiver war, verwendet.

Es ist weiter anzumerken, dass Succinatpuffer im Stand der Technik typischerweise in einer Konzentration von 10 mM vorlagen - damit erhält der Fachmann in D7 keinen Hinweis auf die Verwendungsmöglichkeit von Succinat als Puffer.

Die Ansprüche 18-20 enthalten keine Beschränkung der Menge von Bernsteinsäure und sind daher nicht erfinderisch im Lichte von D7: D7 verwendet 150 mM Bernsteinsäure als Absorptionsverstärker für die intraduodenale Gabe von G-CSF, mit dem Ziel einer solchen Gabe bei der Therapie am Menschen.

Die Bereitstellung eines Kits, in dem G-CSF in Form eines Pulvers, mit oder ohne Succinat (Säure und/oder Salz), zusammen mit einer Succinatlösung dargestellt werden, ist offensichtlich gegenüber D7.

### **D2 als nächster Stand der Technik**

Dokument D2, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird für die Ansprüche 1,13,21,23,24, offenbart mit 5-40 mM Tartratpuffer und Aminosäuren stabilisierte G-CSF Lyophilisate, von denen sich der Gegenstand der Ansprüche 1,13,21,23,24 dadurch unterscheidet, dass ein Succinatpuffer verwandt wird.

Der dadurch erreichte technische Effekt im Falle von Succinat ist eine starke Herabsetzung der Dimerbildung (Tabelle 10) und Aggregatbildung (Tabelle 11) nach Einfrieren / Abtauen, welche für Tartrat weder in der vorliegenden Anmeldung noch im Stand der Technik beschrieben werden.

Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, dass die Dimer- und Aggregatbildung stark herabgesetzt werden soll.

Die in den Ansprüchen 1,13,21,23,24 der vorliegenden Anmeldung vorgeschlagene Lösung kann aus folgenden Gründen nicht als erfinderisch betrachtet werden (Artikel 33(3) PCT):

Dem Fachmann war allgemein bekannt, dass G-CSF ein hydrophobes Glykoprotein ist, ebenso wie IL-2 (siehe zB D1 von 1990).

Er hätte daher versucht, stabilisierende Puffersysteme, welche die gestellte technische Aufgabe für andere hydrophobe Glykoproteine lösen, auf G-CSF zu übertragen.

D12 gibt ein solches Puffersystem für IL-2 an, welches einen 10 mM Succinatpuffer verwendet. Insbesondere beschreibt D12, dass die Aggregat- und Dimerbildung mit dem Puffersystem (und anderen Substanzen) verhindert werden kann und die IL-2 Lösungen unempfindlich gegenüber Auftauen werden.

Der Fachmann hätte daher das Puffersystem aus D12 mit dem Wissen aus D2 kombiniert und wäre zu der Erfindung gemäss den Ansprüchen 1,13,21,23,24 gelangt.

#### **D12 als nächster Stand der Technik**

Dokument D12, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird für die Ansprüche 1,13,21,23,24, offenbart stabilisierte wässrige monomerische IL-2 Lösungen, welche unempfindlich gegenüber Auftauen sind, mit einem 10 mM Succinatpuffer bei pH 5,8 und Arginin, Methionin, nicht-ionische Tenside wie Polysorbat 80, ein Zucker wie Sorbitol oder Mannitol, von den sich der Gegenstand der Ansprüche 1,13,21,23,24 dadurch unterscheidet, dass G-CSF stabilisiert wird.

Der dadurch erreichte technische Effekt ist die Stabilisierung eines weiteren hydrophoben Proteines in wässriger Lösung.

Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden,

dass ein weiteres hydrophobes Protein in wässriger Lösung stabilisiert werden soll.

Die in den Ansprüchen 1,13,21,23,24 der vorliegenden Anmeldung vorgeschlagene Lösung kann aus folgenden Gründen nicht als erfinderisch betrachtet werden (Artikel 33(3) PCT):

Aus D1 war seit 1990 bekannt, dass die beiden hydrophoben Glykoproteine IL-2 und G-CSF in wässrigen Lösungen instabil sind. Es werden in D1 für IL-2 und G-CSF die gleichen Lösungsvorschläge unterbreitet: Die Verwendung eines niedrigen pHs und keines oder eines gering konzentrierten Tartratpuffers.

Der Fachmann hätte aus D1 den Hinweis erhalten, dass die beiden Glykoproteine IL-2 und G-CSF ein ähnliches Verhalten in wässrigen Lösungen zeigen.

Zwar wird ihm in D1 weiter vermittelt, dass die Verwendung eines Puffers nicht zu bevorzugen ist - der Fachmann hätte hierbei jedoch klar erkannt, dass D12 aus dem Jahre 2003 als Quelle wesentlich verlässlicher ist als D1 aus dem Jahre 1990, da auf dem Gebiet der Biotechnologie in diesem Zeitraum enorme Fortschritte erzielt worden sind. Der Fachmann hätte also weiterhin auf die gepufferte Lösung aus D12 gesetzt und versucht, damit G-CSF aus D1 zu stabilisieren.

### **Weitere Überlegungen**

Tartratpuffersysteme wurden im Stand der Technik für G-CSF beschrieben (D1,D2,D4) und ebenfalls für IL-2 (D13) und Interferon (D11).

Succinatpuffersysteme wurden beschrieben für IL-2 (D9, D12) und Interferon (D10, D11). IL-2 weist laut D1, welches sich auf G-CSF und IL-2 gleichzeitig bezieht, diesselben Stabilitätsprobleme auf wie G-CSF.

Tartrat- und Succinatpuffersysteme sind daher dem Fachmann für Proteininjektionslösungen geläufige Standardpuffersysteme im Falle von hydrophoben Proteinen, und dies seit mindestens 15 bzw. 18 Jahren (D9, D10, D11, D13).

Es ist anzumerken, dass keiner der Ansprüche einen physiologischen pH Wert spezifiziert. Anspruch 2 nennt für G-CSF typische pH-Werte von 3,5 - 6,0.

Eine Argumentation darauf basierend, dass durch einen physiologischen pH Wert (7,2-7,4;

siehe zB D2) Schmerzen bei der Injektion verhindert werden können, erscheint unlogisch, wenn das technische Merkmal eines physiologischen pH Wertes nicht in den Ansprüchen zu finden ist.

Eine erfinderische Tätigkeit kann auf keinen Fall daraus abgeleitet werden, dass eine Succinatpuffer evtl. einen grösseren pH-Bereich abpuffern könnte, als ein Acetatpuffer. Die Pufferbereiche von Standardpuffern wie Succinat oder Acetat sind seit mehreren Jahrzehnten hinlänglich bekannt.

Die räumliche Anordnung von lyophilisiertem Protein und der Pufferlösung kann ebenfalls keine erfinderische Tätigkeit verleihen.

#### **Unteransprüche**

Keiner der Unteransprüche scheint technische Merkmale zu enthalten, welche eine erfinderische Tätigkeit rechtfertigen könnten.

Die Ansprüche 1-25 scheinen nicht erfinderisch.

**Patentansprüche**

1. Stabile wässrige G-CSF-haltige Zusammensetzung, welche als  
5 Puffersubstanz Succinat in Form der freien Säure und/oder eines Salzes  
davon in einer Konzentration von 0,5 bis 100 mM umfasst.
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei der pH-Wert der  
Zusammensetzung zwischen 3,5 und 6,0, bevorzugt zwischen 4,0 und  
10 5,8, und besonders bevorzugt zwischen 4,5 und 5,5 liegt.
3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Salz der  
Bernsteinsäure ausgewählt ist aus Alkali-, Erdalkali- oder  
Ammoniumsalzen.
- 15 4. Zusammensetzung nach Anspruch 3, wobei das Salz der Bernsteinsäure  
das Di-Natriumsalz ist.
5. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das  
20 Succinat in einer Konzentration von 1 bis 50 mM vorliegt.
6. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5, wobei  
G-CSF in einer Konzentration von 0,0001 bis 5 mg/ml, insbesondere von  
0,0005 bis 4 mg/ml und bevorzugt von 0,01 bis 1,5 mg/ml vorliegt.
- 25 7. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6, welche  
ferner ein oder mehrere weitere Stabilisierungsmittel und/oder Hilfs- und  
Zusatzstoffe umfasst, insbesondere ausgewählt aus der Gruppe  
bestehend aus Tensiden, isotonisierenden Mitteln, Aminosäuren,  
30 Reduktionsmitteln, Antioxidantien, Komplexbildnern und chaotropen  
Agenzien.

8. Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei das Tensid ein nichtionisches Tensid ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Polyoxyethylensorbitanmonolaureat, Polyoxyethylensorbitanmonooleat, Polyoxyethylensorbitanmonostearat, Polyoxyethylensorbitanmonopalmitat, Polyoxyethylensorbitantrioleat und Polyoxyethylensorbitantristearat.
9. Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei der Komplexbildner Citrat ist.
10. Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei das isotonisierende Mittel Mannit und/oder Sorbit ist.
11. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 10 als pharmazeutisches Präparat.
12. Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei das pharmazeutische Präparat eine Injektions- oder Infusionslösung ist.
13. Lyophilisat oder Pulver, umfassend G-CSF sowie Succinat in Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon, erhältlich durch Lyophilisieren bzw. Sprühtrocknen einer wässrigen G-CSF-haltigen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 10.
14. Lyophilisat oder Pulver nach Anspruch 13, wobei das Salz der Bernsteinsäure ausgewählt ist aus Alkali-, Erdalkali- oder Ammoniumsalzen.
15. Lyophilisat oder Pulver nach irgendeinem der Ansprüche 13 oder 14, wobei das Salz der Bernsteinsäure das Di-Natriumsalz ist.

16. Lyophilisat oder Pulver nach irgendeinem der Ansprüche 13 bis 15, welches ferner ein oder mehrere weitere Stabilisierungsmittel und/oder Hilfs- und Zusatzstoffe umfasst, insbesondere ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Tensiden, isotonisierenden Mitteln, Aminosäuren, Reduktionsmitteln, Antioxidantien, Komplexbildnern und chaotropen Agenzien.
17. Lyophilisat oder Pulver nach Anspruch 16, wobei der Komplexbildner Citrat ist.
18. Arzneimittel-Kit, umfassend räumlich voneinander getrennt:
- a) ein G-CSF-haltiges Lyophilisat oder Pulver; und
  - b) ein wässriges Lösungsmittel, welches Succinat in Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon, umfasst.
19. Arzneimittel-Kit, nach Anspruch 18, wobei das G-CSF-haltige Lyophilisat oder Pulver Succinat in Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon, umfasst.
20. Arzneimittel-Kit, nach Anspruch 18 oder 19, wobei das Lyophilisat oder Pulver und/oder das wässrige Lösungsmittel ferner ein oder mehrere weitere Stabilisierungsmittel und/oder Hilfs- und Zusatzstoffe umfassen, insbesondere ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Tensiden, isotonisierenden Mitteln, Aminosäuren, Reduktionsmitteln, Antioxidantien, Komplexbildnern und chaotropen Agenzien.
21. Verfahren zur Herstellung lagerstabiler wässriger Zusammensetzungen nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 12, welches das Lösen von G-CSF in einem wässrigen Lösungsmittel umfasst, welches als

Puffersubstanz Succinat in Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon in einer Konzentration von 0,5 bis 100 mM umfasst.

- 5 22. Verfahren zur Herstellung eines Lyophilisats oder eines Pulvers nach irgendeinem der Ansprüche 13 bis 17, welches das Lyophilisieren oder die Sprühtrocknung einer Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 10 umfasst.
- 10 23. Verwendung von Succinat in Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon zur Stabilisierung von G-CSF in wässrigen ~~Zusammensetzungen und daraus erhältlichen Lyophilisaten und Pulvern.~~
- 15 24. Verwendung einer Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 10 oder eines Lyophilisats oder Pulvers nach irgendeinem der Ansprüche 13 bis 17 zur Herstellung pharmazeutischer Präparate.
- 20 25. Verwendung nach Anspruch 24, wobei die pharmazeutischen Präparate Hydrogele oder Liposomen umfassen.